

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as First Class Mail in an envelope, addressed to Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C., 20231, on the date indicated below.

BY:

DATE:

Julian Henry 6/23/00 **PATENT**



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In Re: Patent Application of :
Gotz Nowak, et al. : Attention:
Appn. No.: 09/517,863 : **Box Missing Parts**
Filed: March 3, 2000 :
For: Separation Process : Attorney Docket
: No. 9282-010US (D 1062 US)

CLAIM OF FOREIGN PRIORITY AND
TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

Applicant(s) hereby claim(s) the right of foreign priority under 35 U.S.C. Section 119 for the above-identified patent application. The claim of foreign priority is based upon Application No. 199 09 584.1, filed in Germany on March 4, 1999, and the benefit of that date is claimed.

Submitted herewith is a certified copy of German Application No. 199 09 584.1. It is submitted that this document completes the requirements of 35 U.S.C. Section 119, and benefit of the foreign priority is respectfully requested.

Respectfully submitted,

GOTZ NOWAK, ET AL.

June 23, 2000
(Date)

By:

William W. Schwarze
William W. Schwarze
Registration No. 25,918
AKIN, GUMP, STRAUSS, HAUER & FELD, L.L.P.
One Commerce Square
2005 Market Street - Suite 2200
Philadelphia, PA 19103-7086
Telephone: (215) 965-1200
Direct Dial: (215) 965-1270
Facsimile: (215) 965-1210
E-Mail: wschwarze@akingump.com

WWSjf

Attorney for Applicant

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

Die HaemoSys GmbH i. Gr. in Jena/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Trennverfahren"

am 4. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 B, B 01 D und C 07 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 9. Mai 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Weihmayer

Aktenzeichen: 199 09 584.1



PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
 Dr. VOLKER VOSSIUS, Dipl.-Chem.
 (bis 1992; danach in anderer Kanzlei)
 Dr. PAUL TAUCHNER, Dipl.-Chem.
 Dr. DIETER HEUNEMANN, Dipl.-Phys.
 Dr. PETER A. RAUH, Dipl.-Chem.
 Dr. GERHARD HERMANN, Dipl.-Phys.
 JOSEF SCHMIDT, Dipl.-Ing.
 Dr. HANS-RAINER JAENICHEN, Dipl.-Biol.
 Dr. ALEXA VON UEXKÜLL, M. Sc.
 Dr. RUDOLF WEINBERGER, Dipl.-Chem.
 Dr. WOLFGANG BUBLAK, Dipl.-Chem.
 AXEL STELLBRINK, Dipl.-Ing.
 Dr. JOACHIM WACHENFELD, (Biol.)
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
 Dr. RENATE BARTH, Dipl.-Chem.
 Dr. URSULA ENGLBRECHT, Dipl.-Chem.
RECHTSANWÄLTE
 HELGA TREMMEL
 BARBARA GUGGENMOS, Dipl.-Chem.

HaemoSys GmbH i. Gr.

u.Z.: D 1062 DE

SIEBERTSTRASSE 4
81675 MÜNCHEN

POB 860767
81634 MÜNCHEN
GERMANY

TELEFON: +49-89-41 30 40
TELEFAX: +49-89-41 30 41 11 (G 3/G 4)
+49-89-41 30 44 00 (G 3)
(Marken - Trademarks)

04. März 1999

Trennverfahren

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Lösen von linkergekoppelten Substanzen von einer Polymeroberfläche, in dem die Bindung des Linkers zur Oberfläche mittels eines oder mehrerer polarer organischer Lösungsmittel getrennt wird, wobei die Linker gemäß der vorliegenden Erfindung mindestens ein zu einer Wasserstoffbrückenbindung fähiges Strukturelement aufweisen. Polymere, auf deren Oberfläche die erfindungsgemäß zu lösende Bindung auftritt, umfassen, bevorzugt in Seitenketten des Polymergrundgerüsts, Carbonylgruppen in Form von Keto-Gruppen oder Carbonsäurederivaten.

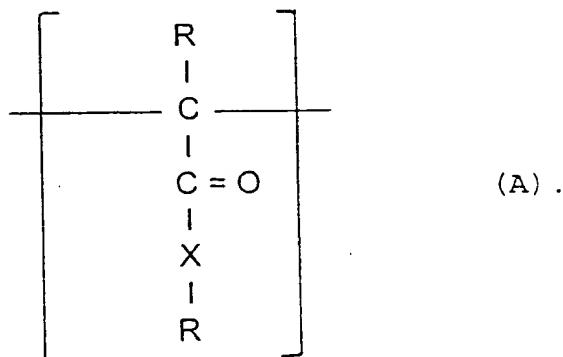
Das Prinzip der Interaktion bestimmter Linker mit solchen Polymeroberflächen ist in WO 98/46648 beschrieben. Es kann beispielsweise dazu verwendet werden, durch Einsatz linker-modifizierter Oberflächen eine Entfernung von Wirksubstanzen aus Flüssigkeiten zu erreichen, oder aber solche Substanzen in Flüssigkeiten zu präsentieren. Die genannte Anmeldung offenbart weiterhin die Anwendung dieses Interaktionsprinzips im

Rahmen umfangreicher medizinischer Verfahren. So können mittels eines Adsorptionssystems bestehend aus einer Polymeroberfläche und einem damit verbundenen Linker der spezifische funktionelle Gruppen aufweist, Wirkstoffe aus Körperflüssigkeiten entfernt werden, die mit dem im Linker vorhandenen funktionellen Gruppen Bindungen eingehen. Weiterhin erlaubt ein solches System das gezielte Einbringen von Wirksubstanzen in den Körper eines Patienten, ohne daß es zu einer weiträumigen Ausbreitung der Substanz im Körper kommt, die zu möglichen Komplikationen und Nebenwirkungen führen könnte. Auch erlaubt das in der Anmeldung beschriebene Kopplungsprinzip eine Modifikation von Oberflächen, die mit physiologischen Systemen in Berührung kommen, wie z.B. Prothesen, Filter für physiologische Flüssigkeiten oder Dialysegeräte. Die Linker, die mindestens ein zur Wasserstoffbrückenbindung fähiges Struktur-element aufweisen, zeigen nach Aufbringen auf die genannten Oberflächen eine erstaunlich hohe Bindungsstärke, so daß sie weder durch Temperaturerhöhung auf bis zu 70°C noch durch Spülen mit wäßrigen Lösungen wieder von diesen Oberflächen zu entfernen waren, selbst wenn die Lösungen hohe Ionenstärken besaßen, wie z.B. 2n Glycin oder 2n Harnstoff-Lösungen, oder pH-Werte zwischen 2 und 13 aufwiesen.

Im Zusammenhang mit bestimmten Anwendungen wäre jedoch die Möglichkeit einer schonenden Ablösung der linkergekoppelten Substanzen von der Oberflächenmatrix wünschenswert. Dies gilt z.B. in solchen Fällen, wo eine Analyse der Substanzen nach ihrer Kopplung mit dem Linker und der Entfernung aus der entsprechenden Flüssigkeit für diagnostische oder Forschungszwecke angestrebt wird. Weiter wäre eine Trennung in solchen Fällen vonnöten, wo vor der erneuten Nutzung der Oberfläche oder der linkergekoppelten Substanz eine oder beide Komponenten sterilisiert werden können, um anschließend einzeln oder gemeinsam wiederverwendet zu werden.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein schonendes, zerstörungsfreies und dabei einfaches und kostengünstiges Verfahren bereitzustellen, mit dem die Trennung eines Systems aus einer Oberfläche und durch Linker daran gekoppelten Substanzen bereitzustellen, um so die Wiederverwertbarkeit aller Komponenten zu sichern. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst, indem das System einem polaren organischen Lösungsmittel ausgesetzt wird. Überraschenderweise wurde gefunden, daß solche Lösungsmittel auch in Form wäßriger Lösungen geringer Konzentration, fähig sind, die Bindung zwischen der linkergekoppelten Substanz und der Polymeroberfläche vollständig zu lösen. Sowohl die Substanzen als auch die Oberflächen behalten nach Lösung der Bindung ihre Funktionsfähigkeit.

Polymere, von denen Linker und daran gekoppelte Substanzen in erfindungsgemäßer Form gelöst werden können, sind beispielsweise in WO 98/46648 beschrieben. Zum Einsatz kommen Homo- oder Copolymer, zu deren Herstellung mindestens ein Monomerotyp eingesetzt wird, der neben einer polymerisierbaren Doppelbindung oder einer polykondensierbaren funktionellen Gruppe eine weitere Carbonylgruppe in Form eines Ketons oder eines Carbonsäurederivats enthält, die nicht an der Polymerisationsreaktion teilnimmt. Bevorzugt enthält das Polymer ein Strukturelement der Formel (A):



wobei die Reste R gleich oder verschieden sein können und einen Alkyl oder Arylrest oder ein Wasserstoffatom darstellen. Der Alkylrest kann linear oder verzweigt sein und besteht bevorzugt aus 1 bis 20 Kohlenstoffatomen. Der Arylrest besteht bevorzugt aus 6 bis 18, besonders bevorzugt aus 6 bis 12 Kohlenstoffatomen. Der Rest X ist fakultativ und bedeutet O, N oder CH₂. Für den Fall X = N trägt N zusätzlich zu dem in Formel (A) vermerkten einen weiteren Rest R, der unabhängig von den anderen Resten R wie vorstehend definiert ist.

Besonders bevorzugt als Alkylrest ist ein geradkettiger oder verzweigter, gegebenenfalls substituierter C₁₋₈-Alkylrest, beispielsweise ein Methyl-, Ethyl- oder Propylrest. Beispiele für gegebenenfalls vorhandene Substituenten umfassen ein oder mehrere Halogenatome, z.B. Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodatome oder Hydroxylgruppen, C₁₋₆-Alkylreste oder C₁₋₆-Alkoxyreste oder C₁₋₆-Alkylthiolreste. Der Arylrest ist besonders bevorzugt ein monocyclischer oder bicyclischer, gegebenenfalls substituierter Arylrest, der gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome enthalten kann. Beispiele für solche Arylreste sind Phenyl, 1- oder 2-Naphthyl, Indenyl- oder Isoindenylreste. Beispiele für heteroatomhaltige Arylreste sind C₃₋₉-Heteroarylreste, die Heteroatome, ausgewählt aus Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatomen, enthalten. Monocyclische Heteroarylreste umfassen beispielsweise Pyrrolyl-, Furyl-, Thienyl-, Imidazolyl-, N-Methylimidazolyl-, N-Ethylimidazolyl-, Benzo-thiazolyl-, Chinazolinyl-, Naphthylpyridinyl-, Chinolyinyl-, Isochinolinyl- und Tetrazolylreste.

Ein bevorzugtes Polymer, das solche Gruppen enthält, ist ein Polyalkylmethacrylat (PAMA), wie z.B. Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyethylmethacrylat (PEMA) oder Polypropylmethacrylat. Besonders bevorzugt aus dieser Gruppe wird Polymethylmethacrylat eingesetzt. Weiterhin können Polyvinyl-

acetat, Polycyclohexylmethacrylate oder Polyphenylmethacrylat eingesetzt werden. Weiterhin können Copolymeren aus beliebigen Anteilen der vorstehend genannten Polymere untereinander oder mit einer oder mehrerer weiterer Polymerkomponenten, beispielsweise Polystyrol, Polyacrylnitril oder Polyamiden eingesetzt werden. Bevorzugt beträgt der Anteil des Polyalkylmethacrylats an solchen Mischpolymeren mindestens 20 %, besonders bevorzugt 40 % und ganz besonders bevorzugt 60 %.

Die Form der eingesetzten Polymeroberflächen ist durch das Prinzip der vorliegenden Erfindung nicht beschränkt. Es können Polymere in Form von Folien, Hohlkörpern wie z.B. Schläuche, Membranen oder Mikropartikeln eingesetzt werden.

Substanzen, die vor der Trennung der entsprechenden Bindung mittels eines Linkers mit der Polymeroberfläche gekoppelt werden, können je nach Anwendung des Systems ausgewählt werden. Bevorzugt werden pharmakologisch oder physiologisch aktive Wirkstoffe eingesetzt. Beispiele hierfür sind Proteine, Nucleinsäuren oder zelluläre Signalstoffe. Besonders bevorzugt ist als Protein ein Enzym, ein Antigen, ein Antikörper, ein Tumormarker, ein Oberflächenantigen, ein Ligand, ein Rezeptor, ein oberflächenaktives Zellfragment von Bakterien oder Viren oder ein Immunbotenstoff. Die pharmakologisch wirksame Substanz ist beispielsweise ein Gerinnungshemmstoff, ein stoffwechselaktives Enzym, oder ein synthetisches Arzneimittel, wie beispielsweise ein Antibiotikum, ein Antitumormittel oder ein Enzyminhibitor. Substanzen, die für das vorliegende System eingesetzt werden, sind ausführlich in WO 98/46648 beschrieben.

Linker, deren Bindung mit einer spezifischen Polymeroberfläche mit dem offenbarten Verfahren gelöst werden kann, sind Moleküle, die mindestens zwei funktionelle Gruppe L1 und L2

aufweisen. Eine dieser funktionellen Gruppen (L1) muß zur Bildung von Wasserstoffbrücken fähig sein und so die Bindung des Linkers an die Polymeroberfläche ermöglichen. Die funktionelle Gruppe L2 wird so gewählt, daß eine Bindung zwischen dem Linker und der zu koppelnden Substanz hergestellt werden kann. Um mehrere Substanzen gleichzeitig auf der Polymeroberfläche aufbringen zu können, ist die gleichzeitige Verwendung mehrerer Linker mit unterschiedlichen Gruppen L2 möglich. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, Linker eines Typs einzusetzen, die mehrere Gruppen L2 besitzen, die gleich oder unterschiedlich sind. Gleichermassen können auch Linker eingesetzt werden, die mehrere gleiche oder unterschiedliche Gruppen L1 aufweisen. Bevorzugt sind L1 und L2 durch eine Alkylkette oder einen Polyether von 1 bis 20 Kohlenstoffatomen verbunden.

Strukturelement L1 ist bevorzugt ein polares Wasserstoffatom, wie es beispielsweise in OH-, SH-, NH- oder PH-Bindungen vorliegt. Dieses Strukturelement befindet sich bevorzugt an einer ausreichend wasserlöslichen Verbindung als Linker, der weiter das Strukturelement L2 trägt. Besonders bevorzugt ist L1 endständig am Linker angebracht.

Die funktionelle Gruppe, mittels derer die Substanz an den Linker gebunden werden kann (L2) ist beispielsweise ein Succinimidylsuccinat, Succinimidylpropionat, Nitrophenylcarbonat, Trisylat, Epoxid, Aldehyd, Isocyanat oder ein Maleinimid.

Funktionelle Gruppen L2, mittels derer die bevorzugten Linker zur Anbindung einer Substanz modifiziert werden können, sind z.B. im Katalog der Firma Shearwater Polymers, Inc., 2307 Spring Branch Rd., Huntsville, AL 35801 (USA) beschrieben.

Bevorzugt werden als Linker Polyalkylenglykole eingesetzt, besonders bevorzugt Polyethylenglykol. Weiter bevorzugt sind Polyalkylenimine, Polyalkylenamine oder Polyalkylensulfide, sowie Polyoxaziline. Insbesondere bevorzugt werden Polyethylenglycole eingesetzt. Die genannten Verbindungen besitzen vorzugsweise ein Molekulargewicht von 5-50 kDa.

Polare organische Lösungsmittel in Sinne der vorliegenden Erfindung sind Lösungsmittel, deren Moleküle eine polare kovalente Bindung aufweisen, die dem Molekül ein elektrisches Dipolmoment verleiht. Die Lösungsmittelmoleküle der im Rahmen der Erfindung einzusetzenden Lösungsmittel besitzen bevorzugt ein elektrisches Dipolmoment in der Gasphase, das größer ist als 1,0 D, besonders bevorzugt größer als 1,4 D und ganz besonders bevorzugt größer als 1,6 D.

Bevorzugt werden organische Verbindungen eingesetzt, die polare Sauerstoffgruppen enthalten, wie z.B. Alkanole und Ester. Bevorzugt werden Alkanole eingesetzt, die bis zu 3 Kohlenstoffatome und bis zu 3 Hydroxylgruppen tragen. Besonders bevorzugt ist Methanol.

Die organischen Lösungsmittel werden bevorzugt in Form einer wässrigen Lösung eingesetzt, deren Lösungsmittelkonzentration bevorzugt kleiner als 70 Volumen-% ist und besonders bevorzugt zwischen 10 und 50 Vol.-% liegt.

Gegebenenfalls ist das Lösungsmittel in Abhängigkeit von der an den Linker gebundenen Substanz so auszuwählen, daß keine irreversible Reaktion der Substanz mit dem Lösungsmittel auftreten kann.

Die Trennung der linkergekoppelten Substanz von der Oberfläche kann sowohl durch Inkubation der linkerbehafteten Oberfläche

im Lösungsmittel, durch Spülung der Oberfläche oder mittels eines Durchströmungsverfahrens erfolgen.

Anhand des folgenden Beispiels soll die Erfindung illustriert werden:

Beispiel

Lösung der PEG-Hirudin-Bindung an Polymethylmethacrylat (PMMA)-Partikel

Poröse PMMA-Partikel werden in zwei Ansätzen mit PEG-Hirudin beladen. Im Anschluß daran erfolgt ein 10minütiger Spülvorgang mit unterschiedlich konzentrierter Methanolösung bzw. in Vergleichsuntersuchungen mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl). Die Spüllösungen werden auf abgelöstes PEG-Hirudin mittels biologischem Funktionsnachweis untersucht und diese wiedergewonnen.

Im Anschluß an die Spülvorgänge der Partikel wird ihre Beladungskapazität durch erneutes Beladen von PEG-Hirudin-Lösungen geprüft. Das aus den Methanol-Spüllösungen rückgewonnene PEG-Hirudin wird ebenfalls auf eine erneute Bindungsfähigkeit zu PMMA-Partikeln getestet.

Mittels Verdünnungen bis zu einer Methanol-Konzentration von 40 % konnten während einer nur 10minütigen Spülung mehr als 80 % des oberflächengebundenen PEG-Hirudins abgelöst und zurückgewonnen werden (Tab. 1; Abb. 1).

Die Wiederverwendbarkeit sowohl gereinigter Partikel als auch rückgewonnenen PEG-Hirudins demonstriert Abbildung 2. Jeweils 50,5 Mio. unbenutzte bzw. gereinigte Partikel zeigten nahezu die gleiche Bindungskapazität für PEG-Hirudin. Ebenfalls dar-

19.04.00

9

gestellt ist das gleiche Bindungsverhalten von unbenutztem und als Methanol-Spüllösung rückgewonnenen PEG-Hirudins.

In allen Versuchen war das oberflächenfixierte PEG-Hirudin funktionell aktiv, was durch die Prüfung der Thrombinhemmvermögens belegt wurde.

Tab. 1

Methanol-Konzentration [%]	PEG-Hirudin-gebunden an PMMA-Partikel [µg]	PEG-Hirudin- rückgewonnen aus Methanol-Spüllösung [µg]
99,9	485,0	436,2
90	464,5	399,4
80	457,5	438,0
70	491,4	468,3
60	530,2	397,0
50	511,6	371,3
40	527,0	430,3
30	538,2	261,0
20	509,8	135,0
0	477,4	in NaCl-Spüllösung: 0,9 µg

P a t e n t a n s p r ü c h e

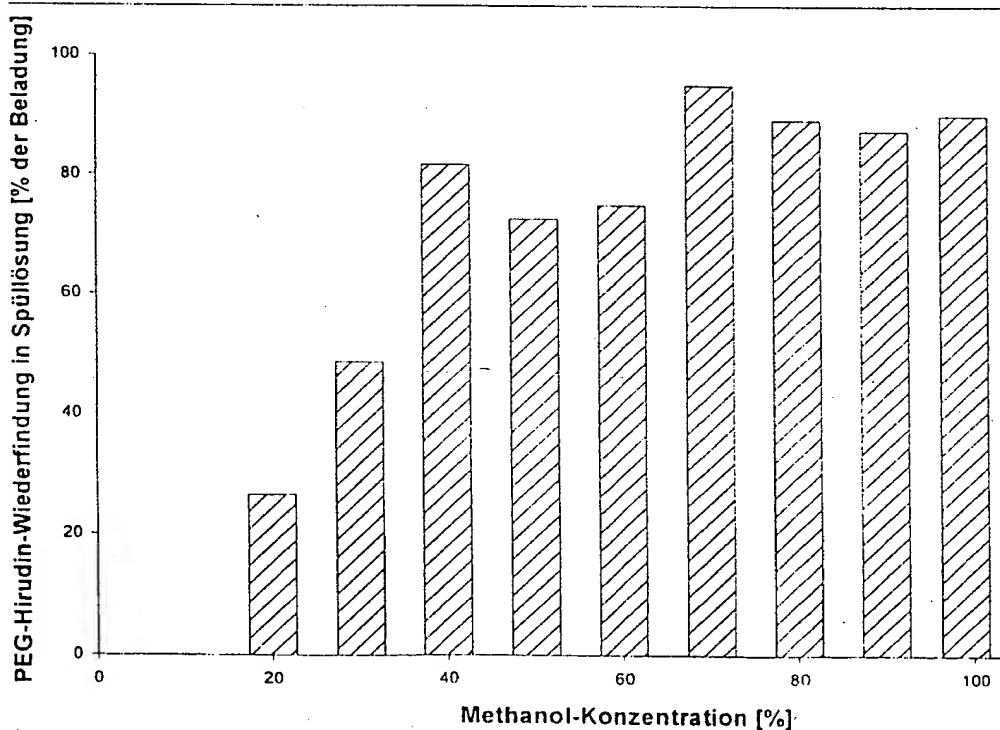
1. Verfahren zum Lösen einer mit Hilfe eines Linkers an eine Polymeroberfläche gebundene Substanz von dieser Oberfläche, wobei die Polymeroberfläche Carbonylgruppen umfaßt und der Linker mindestens eine zur Wasserstoffbrückenbindung fähige funktionelle Gruppe aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung des Linkers an der Oberfläche durch Zugabe eines polaren organischen Lösungsmittels getrennt wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Polymeroberfläche mindestens ein Strukturelement (A) umfaßt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das Lösungsmittel eine polare Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung umfaßt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei das Lösungsmittel ausgewählt ist aus Alkanolen und Estern.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Lösungsmittel Methanol ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Lösungsmittel in Form einer wäßrigen Lösung mit einer Konzentration von maximal 60 Vol.-% eingesetzt wird.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Trennverfahren

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Lösen von mittels eines Linkers an eine Polymeroberfläche gekoppelten Substanzen durch Zugabe eines polaren organischen Lösungsmittels.

Abb. 1: PEG-Hirudin-Ablösung durch 10minütige Spülung mit unterschiedlich konzentrierten Methanolösungen -PEG-Hirudin-Wiederfindung in der Spülösung-



19.04.00

12

Abb. 1: PEG-Hirudin-Ablösung durch 10minütige Spülung mit unterschiedlich konzentrierten Methanollösungen -PEG-Hirudin-Wiederfindung in der Spülösung-

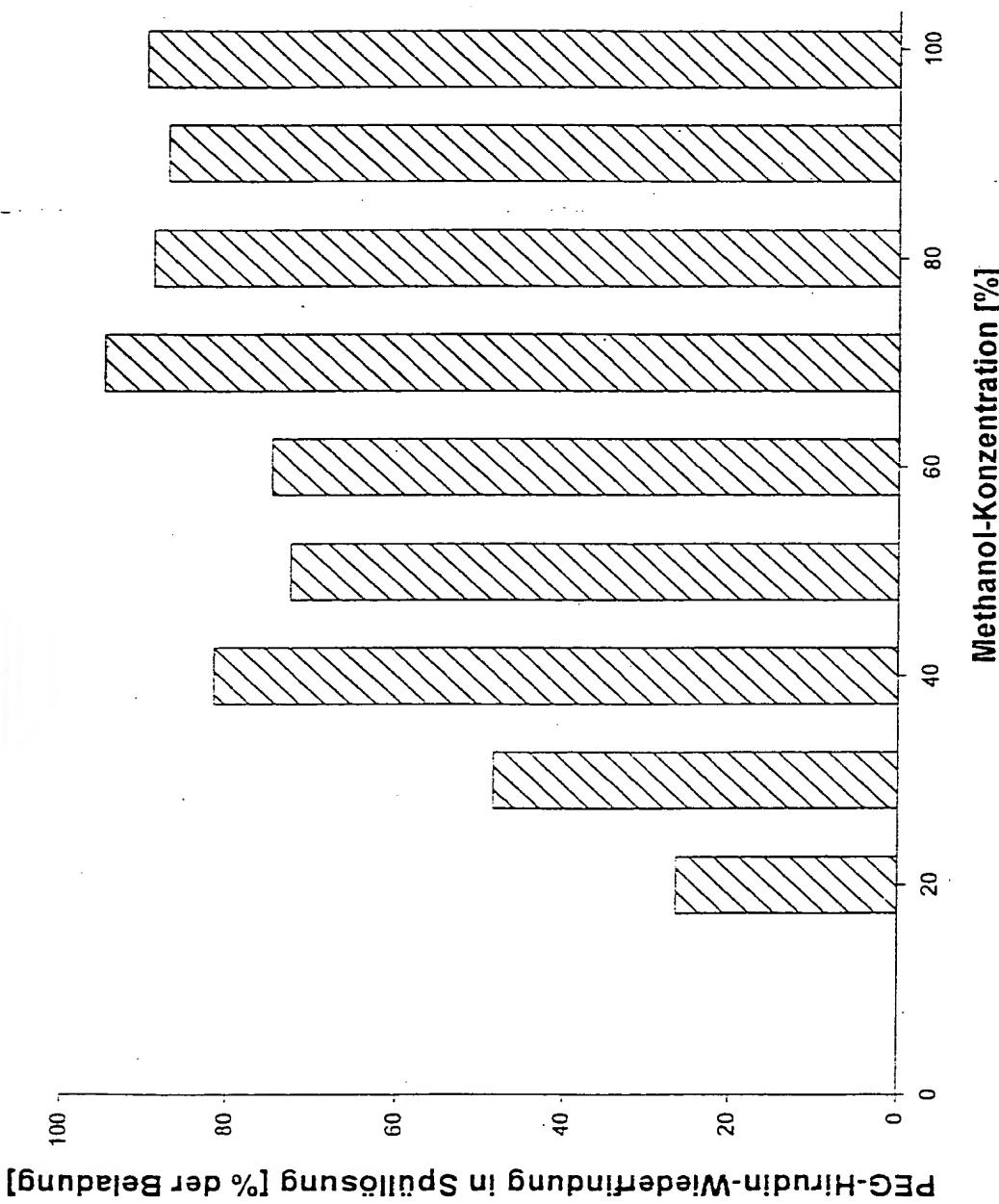


Abb 2: Wiederverwendbarkeit von PEG-Hirudin und PMMA-Partikel nach Trennung der PEG-PMMA-Bindung durch Methanolspülung

